

PROSJEKTOPPGAVE I MEDISINSTUDIET:

TNFalfas rolle ved hjertesvikt og TNFalfas effekter på hjertemuskelceller

TW Baarøy

Innledning

Generelt om hjertesvikt

Myokardinfarkt og hypertensjon er dominerende årsaker til hjertesvikt i vår del av verden er relativ høy. Prevalensen av hjertesvikt øker, dels fordi andelen eldre i befolkningen øker (arteromatose og myokardinfarkt er vanligst hos eldre), dels fordi prevalensen av overvekt og diabetes type II øker hos yngre, og dermed også atheromatose og risiko for myokardinfarkt hos yngre. Hjertesvikt kan skyldes mekanisk overbelastning (trykk eller volum), langvarig arytmi, overstimulering med hormoner/transmittere/vekstfaktorer, inflammatorisk aktivitet, infeksjon eller genetisk predisposisjon.

Ved utvikling av kronisk hjertesvikt ses hypertrofi av hjertemuskelceller, økning i bindevev og intercellulærsubstans (remodellering) og kontraktiliteten (under systolen) reduseres, ofte reduseres også evnen til relaksasjon (under diastolen).

Behandling av hjertesvikt med adrenerge og angiotensinerge blokkere har ført til betydelig bedring for pasienter, men hos mange er ikke dette nok til å forhindre progresjon av svikten, og prognosen ved avansert kronisk hjertesvikt er fortsatt svært alvorlig. Det trengs derfor mer forskning for å forbedre behandlingen.

Celleforandringer ved kronisk hjertesvikt

Tidligere forskning har vist at hjertecellene hypertrofierer, at transporten av natrium og kalsium forandres og at kontraktiliteten reduseres ved svikt. Cellenes gentranskripsjon forandres i føtal retning. Forskning ved UUS, forskningsgruppen i klinisk farmakologi i samarbeid med Institutt for eksperimentell medisinsk forskning, har avdekket at hjerteceller fra rotter med postinfarkt-hjertesvikt har redusert ATP-konsentrasjon og reagerer annerledes på hypoksi-reoksygenering sammenlignet med celler fra "sham"-opererte rotter, slik at mindre natrium tas opp under hypoksi og mindre kalsium akkumuleres i cellene under reoksygenering. Studier av frigjøring av laktat dehydrogenase (LD) er blitt gjort for å få et mål på celledød. Resultatene viser økt LD-frigjøring i svikt-celler sammenlignet med sham-celler, både under normoksi (N) og ved hypoksi/reoksygenering (H/R). Det er imidlertid interessant at den relative økningen i LD-utslipp for sham-celler fra N til H/R er mye større enn hva gjelder svikt-celler. Dette kan antyde en beskyttende funksjon svikt-celler har overfor H/R. (Resultatene er nå blitt publisert i American Journal of Physiology (doi:10.1152/ajpheart.00796.2008)).

Årsaker til og mekanismer for forandringer i cellefunksjon

Mange ulike faktorer kan initiere og videreføre de patofysiologiske prosesser (hypertrofi, kontraktile svikt, forandret fenotype) i hjertecellene ved utvikling av postinfarktsvikt. Det er imidlertid ikke påvist hvilke faktorer som gir de forandringer som er beskrevet ovenfor.

Cytokiner og chemokiner er peptidhormoner som er aktuelle kandidater til slike årsaksfaktorer.

Den kardiopulmonære mRNA-ekspresjon av proinflammatoriske cytokiner/chemokiner som tumornekrosefaktor-alfa (TNFalfa), interleukinene IL-1 og IL-6(1), og monocytt-kjemoattractant protein-1 (MCP-1)(2) er økt i hjertet ved iskemi og infarkt. Cytokiner finnes i atheromatøse plaque og kan bidra til å trombocytaktivering og trombedannelse. Cytokiner aktiverer reseptor-tyrosinkinaser mens chemokiner medierer intracellulær signaloverføring via G-proteinkoblede reseptorer, Gi-proteiner, fosfolipase C, IP3 og kalsium og proteinkinase C. Økt cytokindannelse ved sepsis er assosiert med akutt hjertesvikt.

TNFalfa og hjertesvikt

TNFsalfa er det cytokinet som er best studert i forbindelse med hjertesvikt. Studier viser at det er et direkte forhold mellom TNFalfa-nivåer og den NYHA-klasse pasienten befinner seg i (jfr New York Heart Association's (NYHAs) klassifikasjon for grad av hjertesvikt.) En frisk person uttrykker nesten ikke TNFalfa, mens en person med hjertesvikt i endestadiet uttrykker store mengder. Det er påvist at TNFalfa har en negativ inotrop effekt på hjerteceller, som er reversibel når en fjerner cytokinet. Studier av transgene musehjerter med overekspresjon av TNFalfa, viser betydelige likeheter med menneskets svikt-hjerte: 1.)Patologisk: Fire-kammers dilatasjon, myocythypertrofi, interstitielle infiltrater, ECM-remodellering og fibrose, mindre følsomhet for beta-adrenerge stimuli (3), 2.)Cellulært- og molekylært nivå: genekspresjon i føtal retning, økt ekspresjon av TNF-induserbare cytokiner som MCP og IL1-beta, økt aktivitet i metalloproteinaser, aktivering av både pro- og antiapoptotiske signalveier, nedregulering av fosfolamban og SERCA-ekspresjon og fall i alfa- og beta-myosin heavy chain mRNA-ratio(3).

Effekter av cytokiner ved hjertesvikt

Tidligere forskning har vist at cardiomyocytene hypertrofierer, samtidig som mange av dem undergår nekrose og apoptose. De blir med andre ord større og færre. Fibroblastene proliferer og collagen akkumuleres i ECM. Cellenes gentranskripsjon forandres i føtal retning. Transporten av natrium og kalsium forandres, og kontraktiliteten reduseres. Makroskopisk kan en se et stort, dilatert hjerte. Dette er endringer som kjennetegner et svikt-hjerte. Hva er så mekanismene som ligger bak remodeleringen? Her finnes det nok desverre intet kort og enkelt svar. Forskning viser at en rekke mediatorer er involvert i denne prosessen: nevrohumorale faktorer, cytokiner, enzymer, vekstfaktorer og cellulære faktorer. Ettersom denne oppgaven omhandler cytokiners, og spesielt TNF alfas, virkning på hjertet vil dette temaet bli vektlagt mest.

Cytokiner

Mye tyder på at cytokiner, som TNFalfa og interleukin-6 (IL-6), spiller sentrale roller i utviklingen av hjertesvikt. Kliniske studier viser at plasma-nivåer av TNFalfa er forhøyet hos pasienter med kongestiv hjertesvikt, og myokard-nivåer er oppregulert i endestadiet av hjertesvikt (13). Proinflammatoriske cytokiner produseres i ubetydelige mengder i et friskt hjerte. I gnagermodeller med myokard-infarkt, er det påvist en oppregulering av cytokiner som TNFalfa, IL-1 β og IL-6 intramyokardielt, i tidsrommet fra de første timer til 1 dag etter

infarkt. mRNA-ekspresjonen er betydelig økt, både i infarktområdet (opp til 50 ganger baseline) og i områder i hjertet som ikke er rammet av infarkt (opp til 15 ganger baseline) (12). Dersom infarkt er lite, går denne oppreguleringen tilbake til baseline-nivåer. Er infarkt stort, kan imidlertid enten oppreguleringen av cytokiner vedlikeholdes, eller det kommer en second wave med cytokine-oppregulering tilsvarende den kroniske remodelerings-fasen (12).

Mekanisk stress, iskemisk stress og frie radikaler trigger cytokin-produksjonen (12). Dessuten amplifiserer cytokin-produksjonen seg selv gjennom en positiv-feedback-sløyfe som involverer transkripsjonsfaktoren NF-kB (12). Det resulterer i at en lokalisert oppregulering av TNFalfa i myokardet, induserer oppregulering av TNFalfa i nabo-områder. Inflammatoriske celler som makrofager, nøytrofile granulocytter og mastceller spiller også vesentlige roller i oppreguleringen av cytokiner i myokardet (12)

Hvilke konsekvenser har så denne oppreguleringen av cytokiner på hjertet? Cytokiners effekter på hjertet er utvilsomt svært kompliserte og sammensatte. Det kan være hensiktsmessig å dele inn i akutte og kroniske effekter, og jeg tar da for meg TNFalfa.

Akutte effekter

Overlevelse/apoptose

TNFalfa ligand bindes til to forskjellige reseptorer i cellemembranen: TNF reseptor 1 (TNF-R1) og TNF reseptor 2 (TNF-R2) (3,12). TNF-R1 er den best studerte av de to. Denne reseptoren er medlem i "dødsreseptor-familien". Aktivisering av denne reseptoren aktiverer i siste ledd Fas-assosiert Dødsdomene (12). Dette domenet påvirker procaspase 8, og stimulerer til caspase-8 autoproteolytisk aktivitet. Resultatet blir celledød gjennom å ødelegge cellens egne reparasjonsmekanismer. I tillegg til denne caspase-avhengige signalveien, kan TNF indusere celledød gjennom å rekruttere et protein kalt FAN (12). Dette generer ceramide, som trigger apoptose via en mekanisme postulert til å involvere frie radikaler. Paradoksalt nok fører TNFalfa-stimulering også til aktivisering av beskyttende mekanismer mot celledød. Dette viser hvor komplekse de intercellulære mekanismene er overfor cytokin-stimuli. TNFalfa aktiverer transkripsjonsfaktorene NF-kB (se over) og stress-aktivert protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (JNK), som fører til aktivisering av cytoprotektiv gen-ekspresjon (12). Det kan tenkes at dette er effekter mediert gjennom TNF-R2, men som nevnt tidligere er denne reseptoren foreløpig for lite studert til å trekke den konklusjonen.

Kontraktilitet

TNFalfa nedsetter hjertets kontraktilitet gjennom fire ulike mekanismer (12). Umiddelbart reduserer TNF systolisk Ca^{2+} konsentrasjon gjennom forandringer av sarkoplasmatiske retikulum. Minutter etter eksponering, reduserer TNF hjertets systoliske funksjon gjennom ved å forstyrre L-type calcium-kanaler i

sarkoplasmatisk retikulum via sphingomyelinase pathway. Etter dager skjer det en induksjon av iNOS, som fører til økt produksjon av NO. Dette resulterer i at myofilamentene blir mindre sensitive for calcium. Ved vedvarende økte nivåer hemmes ekspresjonen av SERCA2 (Ca²⁺ ATPase i sarkoplasmatisk retikulum). TNFalfas effekt på hjertets kontraktilitet etter et infarkt er hensiktsmessig i den forstand at det nedsetter myokardets oksygen-behov. Forsøk utført på kaniner viser at TNFalfa initialt induserer en positiv inotrop effekt, før den betydelige negative inotrope effekten trer inn (13).

Vaskulatur og inflammasjonsinfiltrat.

TNFalfa forandrer endotelets fenotype og bidrar til angiogenese og tilheling. Dette skjer gjennom utskillelse av angiogene faktorer som VEGF, HIFalfa og iNOS (12). Cytokiner trigger endret ekspresjon av integriner i endotelet som trengs for at inflammasjonsceller kan vandre ut ekstravaskulært (12).

Oksidativt stress

Cytokiner øker utslipp av frie radikaler og oksidativt stress (12).

Tilheling

Cytokiner og inflammasjonsceller i infarktområdet setter igang tilhelingsprosessen. Dette skjer gjennom fagocytose av nekrotisk vev, overlevelse og hypertrofi av de gjenlevende myocytene, degradering og syntese bindevev, proliferasjon av myofibroblaster, angiogenese og i en begrenset grad til stamcelle-proliferasjon (12).

Konklusjon

Den akutte aktiveringen av cytokiner i det iskemiske og skadete myokardet, er beskyttende hos verten. Dette skjer gjennom å øke tilhelingen og celleoverlevelse, på bekostning av nedsatt kontraktilitet.

Kroniske effekter

Den kroniske effekten av TNFalfa på hjertet kan illustreres ved å se på et forsøk på transgene mus med overekspresjon av TNFalfa i myokardet. Disse fikk alle myokard hypertrofi, dilatert kardiomyopati, infiltrater av inflammasjonsceller og økt interstitiell fibrose (12).

Fibrose

Matrix metalloproteinaser (MMP) er viktige mediatorer i remodeleringsprosessen. MMPs er normalt tilstede i myokard i en inaktiv form, og kan aktiveres etter minutter med iskemi av frie radikaler, cytokiner og hypoksi. Metalloproteinaser medfører nedbrytning av kollagen, og matrix-avleiring. (14) Deres virkning motvirkes av såkalte TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases). Hos transgene mus som med overekspresjon av TNF, økes MMP aktiviteten (14). Utprøving av MMP hemmere er forsøkt hos mus med lovende resultater, men har en alvorlig bivirkning i at angiogenesen også hemmes (12).

Mobilitet og kontraktilitet

Integriner er membranreseptorer i celleoverflaten som er viktige for at cellen skal kunne feste seg i bindevevet. I myocytter er integrin $\beta 1$ assosiert med å feste myocytten til bindevevet. $\beta 1$ finnes i 2 isoformer - $\beta 1D$ som finnes i den voksne myocytt, og $\beta 1A$ som finnes i den føtale myocytt (12). $\beta 1D$ sørger for en fast binding, som er nødvendig for en effektiv kontraksjon. $\beta 1A$ medfører en løsere binding, som legger forholdene til rette for mobilitet og proliferasjon på bekostning av kontraktilitet (12). Eksponering for cytokiner som TNF α , medfører ekspresjon av den føtale $\beta 1A$ -isoformen (12). Resultatet blir økt myocytt-mobilitet og nedsatt kontraktilitet.

Integrin $\beta 3$ er tilstede i nyformede blodkar, og er også under cytokin-kontroll (12). Dette er en mekanisme hvor cytokiner kan regulere angiogenesen etter et infarkt (se under)

Angiogenese og cellerregenerasjon

Chemokiner er chemotaktiske cytokiner som er viktige i reguleringen av angiogenesen. En klasse chemokiner som er studert i denne forbindelse er CXC-chemokiner (12). CXC-chemokiner som inneholder et såkalt ELR-motif, slik som IL-8, er angiogenetiske faktorer. CXC-chemokiner som mangler ELR-motif slik som IP-10 (interferon-inducible protein 10), er angiostatisk faktorer. Balansen mellom chemokiner med og uten ELR motif avgjør om den angiogene aktiviteten. TNF α utslipp fra mastceller induserer IP-10 syntese i det mikrovaskulære endotelet (12). Dette medfører hemming av angiogenesen til det skadede området er stabilt nok ved at det er dannet en midlertidig fibrin-basert matriks. Etter de første 24 timene med reperfusjon, nedreguleres IP-10 mediert av TGF- β (transforming growth factor β) og balansen går i favør angiogenese (12). Angiogenesen resulterer i redusert apoptose av hypertrofierte myocytter og økt overlevelse av myokardet i et langtids perspektiv, redusert kollagen avleiring og bedret hjertefunksjon (12).

Andre faktorer involvert i remodeleringsprosessen

Nevrohumorale faktorer

Nevrohumorale faktorer som angiotensinogen (AT-II), aldosteron, endothelin-1 (ET-1) og noradrenalin spiller også viktige roller i remodeleringen. Etter et myokardinfarkt blir mange av komponentene i renin-angiotensinogen-aldosteron-systemet (RAA), som angiotensinogen, ACE, Ang II type 1 reseptor, oppregulert (14). Det lokale RAA-systemet aktiveres. Ang II induserer hypertrofi av hjertemuskelcellene, fibroblast proliferasjon og collagen syntese (14). Ved kongestiv hjertesvikt er både plasmanivåene og lokale nivåer i LV av ET-1 økt (14). ET-1 er involvert i hypertrofi og collagen-syntese. Noradrenalin bidrar også til remodeleringen ved å indusere hypertrofi og collagen-syntese, samt apoptose (14).

Vekstfaktorer og enzymer

Vekstfaktorer og enzymer er involvert i remodeleringsprosessen. Nevnte

faktorer samspiller slik at nevrohumorale faktorer og cytokiner regulerer produksjon og aktivitet til vekstfaktorer og enzymer. Et eksempel på dette er at Ang II induserer økt produksjon av TGF- β , som spiller en kritisk rolle i utvikling av hypertrofi av myocytene, fibrose-dannelse og angiogenese (se over) (14). Den hemopoetiske vekstfaktoren EPO, har vist seg å ha positive virkninger på hjertet. Det motvirker apoptose, og bedrer den hemodynamiske funksjonen til hjertet (12). Disse fordelaktige effektene kan være som resultat av mobilisering av sirkulerende stamceller, noe som er blitt observert ved hjerneskader (12). IL-3, IL-6 og G-CSF (granulocyte macrophage colonystimulating factors) er hemapoetiske vekstfaktorer og stimulerer granulopoesen (12). G-CSF virker også ved å øke utslipp av hemapoetiske stamceller i den perifere blodsirkulasjon (se under).

Cellulært aspekt

Monocyt-deriverte makrofager, mastceller og myofibroblaster utskiller proteaser og vekstfaktorer som er nødvendig for tilhelingsprosessen og dannelse av nye blodkar (12). Inflammatoriske mediatorer kan rekrutere blod-deriverte primitive stamceller til infarkt-området, som kan differensieres til endotelceller og til en viss grad nydannelse av myokard (12).

Hypotese

Vår hypotese er at cytokiner som TNF α fremkaller en endret fenotype av hjertemuskelceller, med redusert ATP-nivå, redusert natrium- og kalsium-opptak ved hypoksi-reoksygenering og redusert glukose-opptak ved reoksygenering etter hypoksi. Når det gjelder LD-frigjøring er det vanskelig å spå noe bestemt utfall. Vi velger å måle denne parameteren, fordi vi syntes det er interessant å se hvordan TNF α påvirker celledød og celledød. I våre forsøk tror vi at ikke bare nekrotisk, men også apoptotisk celledød vil kunne øke LD-utslipp, ettersom det ikke er fagocyterende celler til stede i cellekulturen.

Hensikt med undersøkelsen

Hensikten er å undersøke effektene av cytokiner som TNF α på kalsium- og glukose-opptak og LD-frigjøring i rotte kardiomyocytter isolert fra friske rotter, for å teste den oppsatte hypotese.

Metoder og materiale

Kjemikalier og materialer

Følgende kjemikalier ble skaffet fra Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA: bovine serum albumin (BSA, fri for essensielle fettsyrer), insulin, taurine, trypsin, triiodothyronine (T3), DL-carnitine, dibutyl phtalate og sodium dodecyl sulfate (SDS). Joklik minimum essential medium (MEM) var fra Life technologies Ltd, Paisley, UK. Collagenase og deoxyribonuclease var fra Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ble skaffet fra Dupont de Nemours GmbH, NEN Divisjon, Dreiech, Tyskland. Micro BCA Protein Assay Reagent var fra Pierce, Rockford, IL, USA. Di- ^{125}I -isononyl phtalate og EGTA var fra Fluka Chemie AG Buchs, Sveits. Opti-fluor var fra Packard, Groningen, Nederland.

Buffer

Normal fysiologisk buffer (NPB): sammensetning i mM: NaCl 120,0, KCl 3,3, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄ 0,8, NaHCO₃ 24,0; pH 7,4.

NPB-1: NPB tilsatt CaCl₂ 0.5 mM og BSA 1% (w/v).

NPB-2: NPB tilsatt CaCl₂ 1.0 mM og BSA 0.1 % (w/v)

Prosedyre

Uttak av hjerte



Celleisolering



Dyrkning m/u TNFalfa

0t



Eksperiment start: Hypoksi/normoksi

16(40)t



Reoksygenering

20(44)t



Prøvetakning

20(44)t, 21(45)t og 22(46)t

Celleisolering og dyrkning

Voksne Wistar hann-rotter, 250-350 g, ble anestesert ved injeksjon av pentobarbital (100 mg/kg) i.p. Hjertet ble operert ut og perfundert via kanyler i aorta og derved via coronararteriene med kald (5-10grader) kardioplegiløsning. Hjertene ble først perfundert i romtemperatur (25grader) i 10min med Ca²⁺-fri Joklik MEM tilsatt 1,2 mM MgSO₄, 23,8mM NaHCO₃, 1mM DL-carnitine og 62,1 U/ml trypsin (løsning A), kontinuerlig gasset med 95% O₂ – 5% CO₂. Hjertene ble deretter perfundert i et resirkulerende system i 25min med løsning B1 (løsning A tilsatt 200 U/ml collagenase og 0,1 % BSA, 37grader) med en fart på 6-7 ml/min. Ventriklene ble åpnet, renses fra evt trombotisk materiale og klippet i småbiter i løsning C (løsning A uten trypsin, tilsatt 0,5mM CaCl₂ og 1 % BSA) og inkubert i ristende vannbad (150 rpm, 37grader) i 10min. Løsningen ble så sentrifugert i 30sek.500rpm og supernatanten suges av. Cellene ble deretter inkubert i løsning B tilsatt DNase i ristende vannbad i 15min. Etter rundt åtte min, stoppes riste-badet og hjertene rives ytterligere fra hverandre vha pinsetter. Løsningen ristes så de siste 7min, før løsningen igjen sentrifugeres i 30 sek. 500rpm og supernatanten suges av. Cellepelletten tilsettes så løsning C, samt CaCl₂ i konsentrasjonen 1mM. Cellesuspensjonen filtreres gjennom en 250µm nylonduk, før en ny runde med sentrifugering (30sek.500rpm) og supernatanten suges av. Cellepelletten resuspenderes i DM (Medium 199 M-7528 Sigma, 100µU/ml insulin and 1 % BSA). Cellene dyrkes på laminin-precoatede Costar-6-dyrkningsbrett i 16 (og evt 40) timer i dyrkningsskap med 37grader, 95 % luft, 5 % CO₂ og PO₂ på 17kPa. DM ble skiftet etter 2 timer med ferskt DM og halvparten av brønnene ble tilsatt 50 ng/ml TNFalfa.

Hypoksi/reoksygenering-eksperiment

Etter 16 (og evt 40) timer ble DM skiftet med NPB -2 tilsatt spormengder 45Ca²⁺ (5*10⁶DPM/ml)og trypsin, og stod i et 37graders vannbad og ble gasset med 95 % luft og 5 % CO₂. Halvparten av brønnene tilsettes TNFalfa. Normoksia-cellene ble tilsatt 5,5 mM glukose, ikke H/R-cellene. N- og H/R-cellene plasseres i to ulike dyrkningsskap med henholdsvis normoksiske og hypoksiske forhold. 3HDOG tilsettes avhengig av prøvetidspunkt: prøve 4t tilsettes på tid 0, prøve 5t på etter 4t, og prøve 6t etter 5t. Brønner som brukes til måling av LD tilsettes verken trypsin, 45Ca²⁺ eller 3H-DOG. Etter 4 timer hypoksi, reoksygeneres cellene, og tilsettes 5,5mM glukose.

LD utslipp

Utslipp av lactate dehydrogenase (LD), ble målt med den kvantitative kinetiske metoden (med 340 nm absorpsjon bølglengde) av Wroblewski og LaDue i inkubasjonsbuffer.

Glukose og Ca²⁺ opptak

Intracellulært calcium og glukose ble bestemt ved opptak av henholdsvis ⁴⁵Ca²⁺ og ³H-DOG. Et 20ml Falcon-rør (Oxnard, CA, USA) ble tilsatt 500µl oljeblanding (dibutyl phthalate og di-²-isononyl-phthalate, 45-55% w/w) under 8,5 ml NPB-2, og plassert i isvann (0-5grader). En del av celsuspensjonen (200µl) ble tilsatt bufferfasen og røret ble sentrifugert (2000*g, 2 min) og cardiomyocytene passerer gjennom oljen og setter seg i bunnen av røret. Tuppen av røret (inneholder cellepelletten) ble klippet av pelletten ble løst i 1ml SDS 1%.

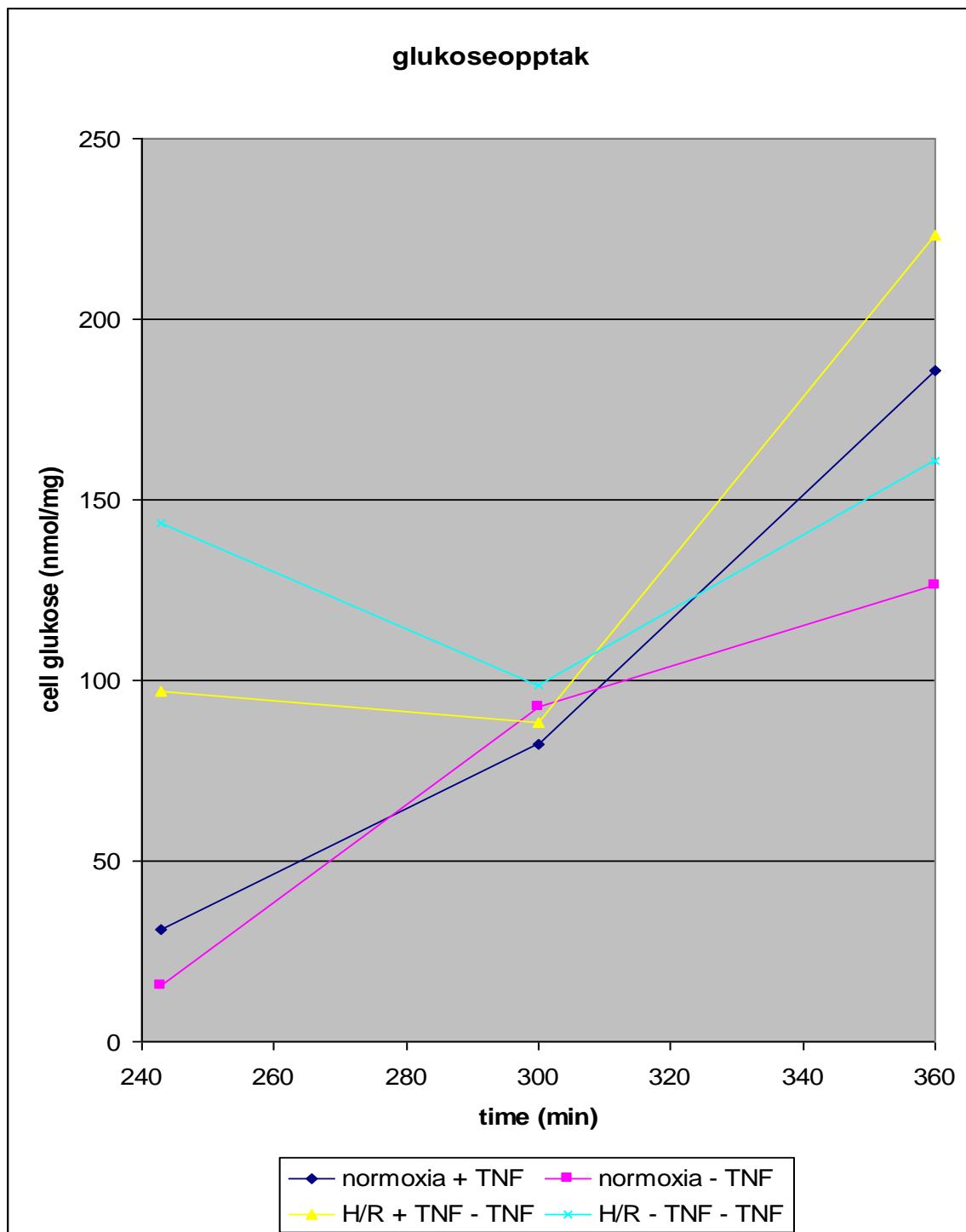
Radioaktiviteten ble bestemt vha væske scintillasjon telling (liquid scintillation cocktail, Opti-Fluor, Packard). Protein-innholdet måles med Micro BCA Protein Assay Reagent (med BSA som standard) i hver pellett og avleses i microtitterplate av plateleser.

Opptaket ble beregnet vha standarder tatt fra buffer og måling av protein-innholdet i celleprøven. Standardprøvene ga oss den spesifikke aktiviteten ved at vi dividerte målt isotop(DPM) i standard på konsentrasjonen av calcium/glukose i mediet. Videre dividerte vi målt DPM i celleprøven på spesifikk aktivitet, og fikk dermed mengden intracellulært calcium/glukose. Denne mengden relaterte vi til celleprotein ved at vi dividert på proteininnhold i celleprøven.

Resultater

Glukoseopptak

Glukoseopptaket ble studert etter 16 timers dyrkning, og 4 timer med hypoksi. Halvparten av cellene ble tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet, og andre halvparten ikke. Noen brett ble holdt under normoksi hele perioden. Etter 4 timer hypoksi ble cellene reoksygenert. Det ble tatt prøver 4 timer, 5 timer og 6 timer etter hypoksi-start. Fire timer etter tilsetning av glukose, hadde de normoksiske cellene vesentlig lavere glukoseopptak enn H/R-cellene. På dette tidspunkt viste de normoksiske cellene som var tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet, noe høyere glukoseopptak enn de normoksiske cellene uten tilsatt TNFalfa. For de hypoksiske cellene cellene var det omvendt. Glukoseopptaket var like etter reoksygenering, høyest i de cellene som ikke ble eksponert for TNFalfa i dyrkningsmediet. Fem timer etter tilsatt glukose, var det liten forskjell mellom de ulike cellene. Etter seks timer hadde de cellene som var tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet, det høyeste glukoseopptaket. Både hos de cellene som var eksponert for TNFalfa og ikke, hadde H/R-cellene høyere opptak enn de normoksiske. (Resultatene er vist i figur 1) Vi har gjort inntil 4 eksperiment for hver av verdiene. (På normoksi-verdiene har vi 4 forsøk for hver av verdiene etter 4 timer, 2 forsøk for hver av verdiene etter 5 timer, og 2 forsøk for hver av verdiene etter 6 timer. Når det gjelder H/R-verdiene har vi 4 forsøk for hver av verdiene etter 4 timer, 3 forsøk for hver av verdiene etter 5 timer og 4 forsøk for hver av verdiene etter 6 timer.)



Figur 1: Glukoseopptak

H/R: - Opptak er lavere under påvirkning av TNFalfa, etter hypoksi. 2 timer etter reoksygenering er opptaket høyere under påvirkning av TNFalfa.

Normoxia: - Opptaket virker noe høyere under påvirkning av TNFalfa

MERK: Første TNF står for TNFalfa tilsatt i dyrkningsmediet. Andre TNF står for TNF tilsatt i buffer på forsøksdag. Vi har bare verdier fra TNFalfa tilsatt i buffer på forsøksdag, fra to forsøk. Verdiene har hatt for stor variasjon, og vi valgte derfor å utelate disse i figur. Stor variasjon og få verdier er også grunnen til at vi har utelatt figur på glukose-opptak fra dag 2.

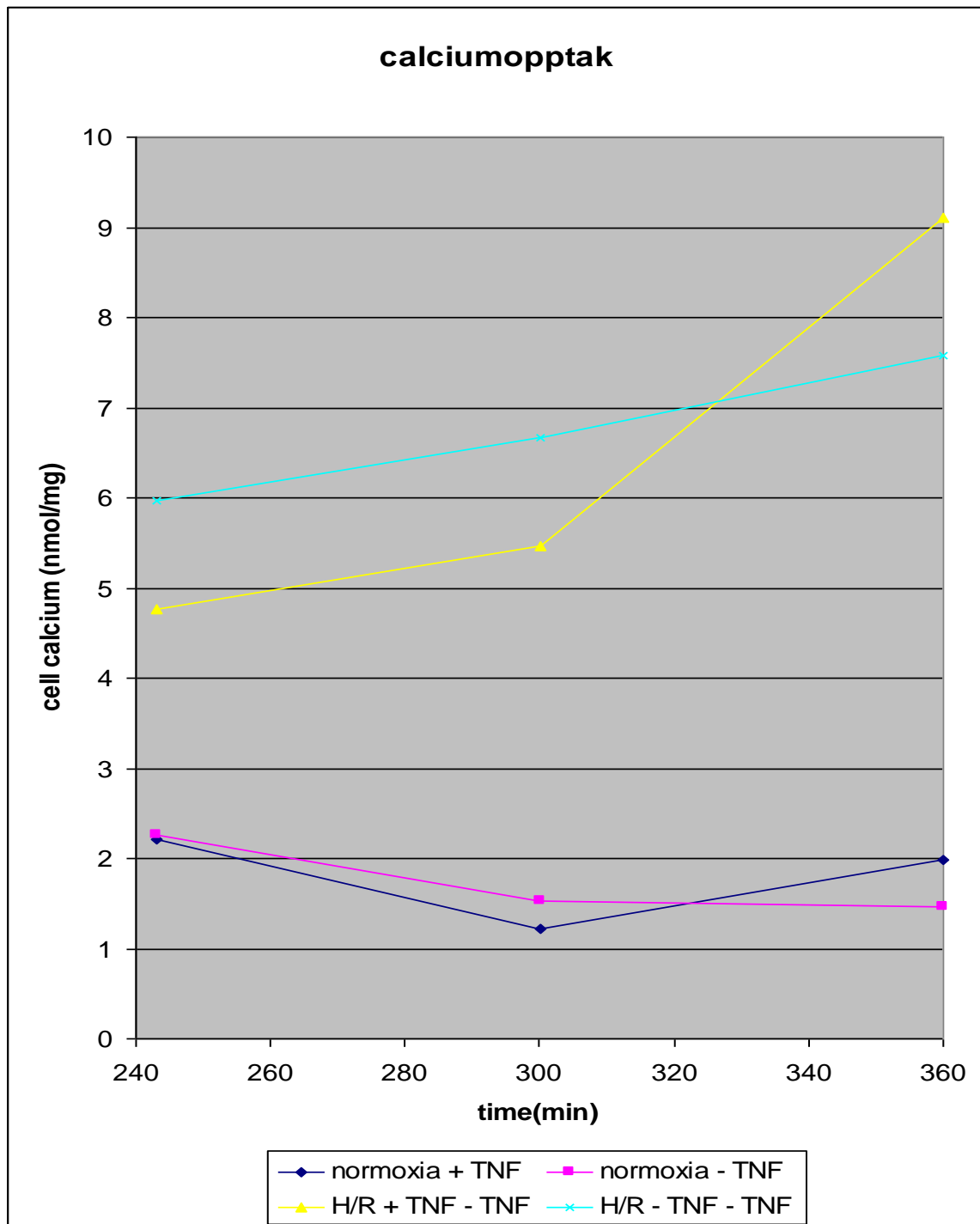
Kalsiumopptak

Calciumopptaket ble studert etter 16 timers dyrkning, og 4 timer med hypoksi. Halvparten av cellene ble tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet, og andre halvparten ikke. Noen brett ble holdt under normoksi hele perioden. Etter 4 timer hypoksi ble cellene reoksygenert. Det ble tatt prøver 4 timer, 5 timer og 6 timer etter hypoksi-start. Resultatene viser at calciumopptaket er vesentlig lavere i de normoksiske cellene enn de H/R. For H/R-cellene er opptaket lavere hos de cellene som fikk tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet, både på tidspunktet for reoksygenering og en time etter reoksygenering. To timer etter reoksygenering er imidlertid opptaket høyest hos de TNFalfa eksponerte cellene. For de normoksiske cellene er det liten forskjell mellom cellene som er blitt eksponert for TNFalfa og ikke. (Resultatene er vist i figur 2). Vi har gjort inntil 4 eksperiment for hver av verdiene. På normoksi-verdiene har vi 4 forsøk for hver av verdiene etter 4 timer, 2 forsøk for hver av verdiene etter 5 timer, og 2 forsøk for hver av verdiene etter 6 timer. Når det gjelder H/R-verdiene har vi 4 forsøk for hver av verdiene etter 4 timer, 3 forsøk for hver av verdiene etter 5 timer og 4 forsøk for hver av verdiene etter 6 timer.

LD-frigjøring

Utslipp av laktatdehydrogenase (LD) ble studert etter 16 timers (dag 1) og 40 timers (dag 2) dyrkning, og 4 timer med hypoksi. Halvparten av cellene ble tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet, og andre halvparten ikke. Noen brett ble holdt under normoksi hele perioden. Etter 4 timer med hypoksi ble cellene reoksygenert. Det ble tatt prøver 6 timer etter hypoksi-start. Det er en klar tendens i våre forsøk til at TNFalfa senker utslipp av LD. Etter 16 timers dyrkning, slipper normoksiske celler tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet ut mindre LD enn cellene uten tilsatt TNFalfa. I H/R-cellene med tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet, viste de cellene som ble tilsatt TNFalfa i buffer på forsøksdag lavere utslipp. Det samme var tilfelle for H/R-cellene som ikke var tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet. Videre viste forsøkene at normoksiske celler slipper ut vesentlig mindre LD enn H/R-celler. H/R-cellene som hvor man hadde tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet, viste noe lavere LD-utslipp enn de uten.

Etter 40 t dyrkning, kan man se lignende tendenser. Her så man imidlertid noe høyere LD-utslipp i de normoksiske cellene med tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet, sammenlignet med de uten. For H/R-cellene både med og uten tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet, viste cellene som ble tilsatt TNFalfa i buffer på forsøksdag vesentlig lavere verdier enn cellene uten tilsatt TNFalfa. Forskjellen i utslipp mellom H/R-celler som ble tilsatt TNFalfa og ikke, var enda større for dag 2 enn for dag 1. I likhet med dag 1, hadde de normoksiske cellene lavere utslipp enn de H/R-cellene. Imidlertid så man ingen klar forskjell mellom H/R-celler tilsatt TNFalfa i dyrkningsmediet og ikke. (Resultatene er vist i figur 3 og fig.4.) Verdiene fra dag1 er gjennomsnittsverdien fra 4 forsøk, mens verdiene fra dag 2 beror på verdier fra 2 forsøk.



Figur.2: Calcium-opptak

H/R: - Opptak er lavere under påvirkning av TNFalfa etter hypoksi 2 timer etter reoksygenering er opptaket høyere under påvirkning av TNFalfa.

Normoxia: - Liten effekt

MERK: Første TNF står for TNFalfa tilsatt i dyrkningsmediet. Andre TNF står for TNF tilsatt i buffer på forsøksdag. Vi har bare verdier fra TNFalfa tilsatt i buffer på forsøksdag, fra to forsøk. Verdiene har hatt for stor variasjon, og vi valgte derfor å utelate disse i figur. Stor variasjon og få verdier er også grunnen til at vi har utelatt figur på calcium-opptak fra dag 2.

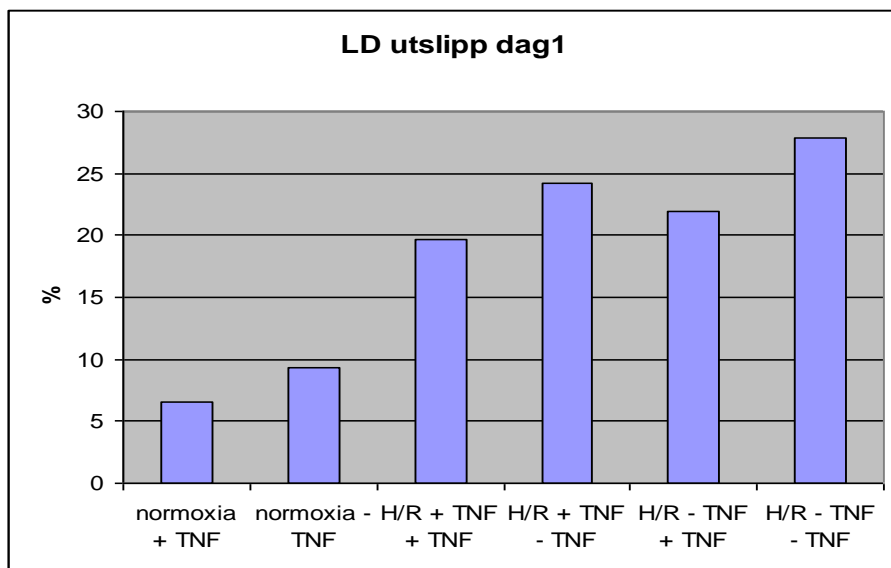


Fig.3:LD-utslipp dag 1

- LD-utslippet er lavere under påvirkning av TNFalfa både under H/R og N.
- Antall forsøk: 4

MERK: Første TNF står for TNFalfa tilsatt i dyrkningsmediet. Andre TNF står for TNF tilsatt i buffer på forsøksdag.

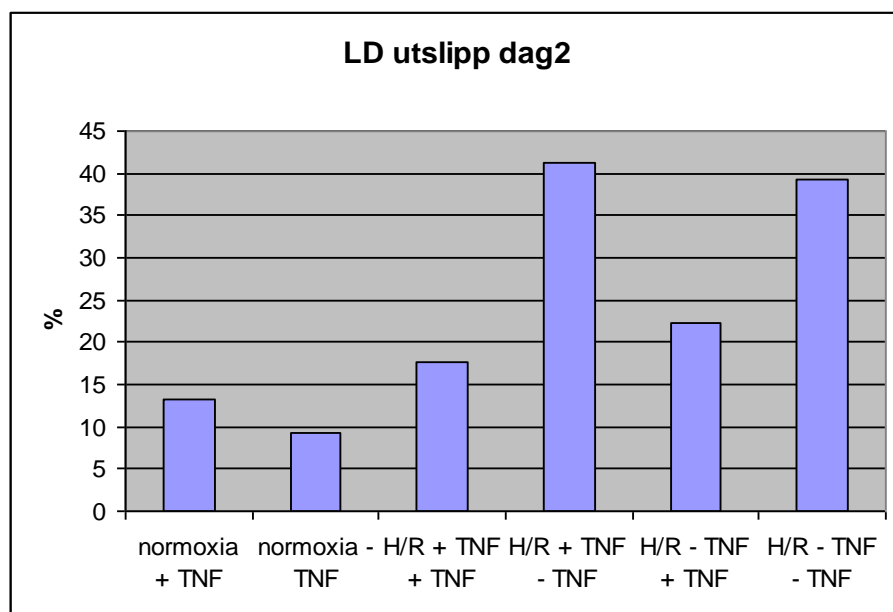


Fig.4: LD-utslipp dag 2

- LD-utslippet er lavere under påvirkning av TNFalfa etter H/R. Motsatt tendens under normoksi.
- Antall forsøk: 2

MERK: Første TNF står for TNFalfa tilsatt i dyrkningsmediet. Andre TNF står for TNF tilsatt i buffer på forsøksdag.

Diskusjon

Ca²⁺-opptak

Resultatene våre viser redusert opptak av Ca²⁺ i hypoksi-perioden hos TNFalfa-stimulerte celler sammenlignet med kontroll-celler. Dette samsvarer med vår hypotese om at TNFalfa-stimulering gir en endret fenotype av hjertemuskelceller som ligner svikt-celler. Etter 6 timer (dvs 2 timer etter reoksygenering) er nivået av intracellulært kalsium imidlertid høyere i TNFalfa stimulerte celler enn i kontroll.

Hypoksi medfører lavt ATP-nivå i cellen og gir dermed mindre aktivitet i Na⁺/K⁺-ATPasen. Dette resulterer videre i opphopning av Na⁺ intracellulært, økt utbytting av intracellulært Na⁺ med ekstracellulært Ca²⁺, og dermed økt intracellulært Ca²⁺. Denne effekten ser vi i forsøkene, hvor normoksiske celler har langt lavere intracellulært Ca²⁺-nivå enn hypoksi/reoksygenererte celler. Studier viser at denne effekten er mindre uttalt i cardiomyocytter fra svikt-rotter enn i sham-rotter (Sharikabad upublisert). Altså vil Ca²⁺-opptaket i hypoksi-perioden være lavere i hjertesvikt-celler enn i friske celler.

Glukose-opptak

Våre resultater viser lavere opptak like etter hypoksi-perioden (tid: 4t) i TNFalfa stimulerte celler sammenlignet med kontroll. Men som for Ca²⁺-opptak, er bildet snudd på hodet etter 6 timer, der TNFalfa-stimulerte celler har ett høyere intracellulært nivå av glukose enn kontroll. Det er gjort studier på glukoseopptak i cardiomyocytter fra svikt-rotter og sham-rotter etter 4 timer hypoksi, og glukoseopptaket ble målt fra 5-6 timer. Disse har vist et betydelig lavere opptak i svikt-celler enn sham-celler (Sharikabad upublisert). Det er rapportert at følsomheten for insulin, som regulerer glukoseopptak i hjertet via GLUT4-rekruttering til cellemembranen, reduseres av cytokiner som TNFalfa(4).

LD-utslipp

I våre forsøk reduserte TNFalfa frigjøring av LD etter hypoksi. Dette kan tyde på at TNFalfa på enkelte områder kan beskytte cellen mot hypoksi. I følge studier, kan TNFalfa både stimulere en celle til å gå i apoptose og virke antiapoptotisk, avhengig av hvilken reseptor og intracellulære signalvei som stimuleres. Man mener at aktivering av NFkappaB er et sentralt steg i TNFalfa-mediert apoptose, mens aktivering STAT-3 kan føre til transkripsjon av overlevelsesgener(5-8).

Resultatene har vist spennende tendenser, og delvis gått i tråd med hypotesene. Det har dessverre vært litt for stor variasjon i resultatene til å si at forskjellene vi har funnet med TNFalfa-stimulering, er signifikante. Det har vært til dels stor variasjon fra forsøk til forsøk, og innen alle de tre parametrene vi målte. Det er mange faktorer som kan være med å forklare den store variasjonen. For det første er det et teknisk krevende arbeid, med lange prosedyrer og mange trinn, og dermed mange muligheter til å gjøre feil. Vi har imidlertid fått gode celler i forsøkene, som vi har tatt bilde av, noe som tyder på at utførelsen har vært vellykket. En annen feilkilde kan være isotop-telleren, som har variert noe i verdiene av standarder fra gang til gang. En tredje forklaring kan være at effektene av TNFalfa evt. kommer etter vi har gjort forsøk (f.eks etter tre dager), eller at effekten er umiddelbar men går raskt over. En fjerde faktor som kan spille inn er hvis det er ulikt antall TNFalfa-reseptorer, og ulikt forhold TNFR1/TNFR2, mellom individer. Har cardiomyocytter fra naive rotter, TNFalfa-reseptorer i det hele tatt? Litteraturen antyder dessuten at enkelte elementer må være til stede, for at TNFalfa skal ha en bestemt effekt. F.eks må reaktive oksygen radikaler (ROS) være til stede for at TNFalfa skal øke produksjonen av MCP-1(9). I våre celler er det mye buffer/DM i

forhold til celler, noe som kan bety at oksygenradikalene ikke blir oppkonsentrert tilstrekkelig. Kan det tenkes at TNFalfas virkninger på hjerteceller primært er mediert gjennom stimulering til økt produksjon av andre cytokiner som utøver den direkte effekten på cellene(10;11)? For å undersøke det nærmere vil det være interessant å se på effektene av TNFalfa med oksygenradikaler til stede(7;8). Ytterligere eksperiment er nødvendig for å for å klarlegge sikkert effektene av TNFalfa.

Litteraturen idag

Det er nå gått over to år siden jeg utførte forsøkene, så jeg prøvde å finne ut hva som har skjedd på dette feltet siden. Spesielt lurte jeg på om det var prøvd ut anticytokin-behandling, eller evt annen antiinflammatorisk behandling, på mennesker med hjertesvikt. Jeg brukte søkemotoren PubMed med søketermene "TNFalpha AND heart failure AND review".

Som tidligere nevnt, aktiveres immunsystemet ved hjertesvikt. Dette kan skje både ved direkte antigenstimulering, som ved myokarditt, men også sekundært til skade av hjertet (15, 16). Ved skade av hjertet, blir nye antigene peptider presentert i myokardet, som er i stand til å trigge en immunrespons (15). Etter myokardinfarkt, ser man infiltrat av inflammatoriske celler i infarktområdet. Man kan også påvise antistoffer mot hjerte-spesifikke proteiner (f.eks er det påvist antistoffer mot myosin og β -reseptor hos enkelte pasienter med hjertesvikt (15). Det er også evidens for at komplement-systemet aktiveres, og at MHC II uttrykkes i økt omfang (15). Ved hemodynamisk overload, slipper myokard-celler ut cytokiner. (15) Noe som indikerer at en volumbelastning som overgår hjertets kapasitet, er istand til å produsere inflammasjon i hjertet, selv uten tidligere skade.

Da det er liten tvil om at inflammasjon spiller en viktig rolle i utvikling av kronisk hjertesvikt, er det naturlig at antiinflammatorisk-terapi kunne vært nyttig i behandlingen av hjertesvikt. Det er i de senere årene utført kliniske studier hvor en har forsøkt å hemme inflammasjonen i hjertet. Litteraturen beskriver to ulike tilnærminger til en slik behandling (15,16,17).

Høy-spesifikk strategi

TNFalfa er det cytokinet som er best studert ved kronisk hjertesvikt. Mye tyder på at dette cytokinet spiller en betydelig rolle i utviklingen av hjertesvikt (se over). Det er blitt utført flere randomiserte kontrollerte studier hvor en har gitt TNFalfa-hemmere til pasienter med hjertesvikt (15,16,17).

Etanercept er et rekombinant humant TNF-reseptorprotein som binder sirkulerende TNF. Det inaktiverer TNFalfas funksjon ved å hindre at cytokinet binder seg til sin reseptor på celleoverflaten. Det er blitt utført to store kliniske studier med utprøving av etanercept, en i Nord-Amerika og en i Europa. Man har gjort en kombinert analyse av resultatene (RENEWAL=Randomized Etanercept Worldwide Evaluation). Klinisk endepunkt for studien var mortalitet og hospitalisering grunnet hjertesvikt. Forsøkspersonene var pasienter med NYHA klasse II-IV og LVEF mindre eller lik 0,3. Studiene var randomisert, dobbeltblindet og placebo-kontrollert. Man fant ingen klinisk nytteverdi sammenlignet med placebo. (15,16,17)

Et annet anti-TNF-agens, som er blitt undersøkt er infliximab, et kimerisk (mus/human) immunoglobulin-G1 monoklonalt antistoff som binder både TNFalfa som befinner seg i sirkulasjonen og som er membranbundet. Studien ble kalt ATTACH (Anti-TNFalpha Therapy

Against HF). Studien var designet på samme måte som RENEWAL. Man ble desverre nødt til å avbryte studien før en opprinnelig hadde tenkt seg, grunnet økende insidens av forverret hjertesvikt. (15,16,17)

Det finnes mange forklaringer som kan være med å forklare hvorfor anticytokine-behandlingen sviktet. En mulighet er feil dosering (16). Anti-TNF-behandlingen kan ha senket TNFalfa-nivåene til under de fysiologiske nivåene som er påkrevd for reparering av myokard. Dosene kan og ha vært for lave, og ikke tilstrekkelige til å nøytralisere TNFalfas effekter. Kjønn og etnisitet kan være viktige variable som gjør at dosene må tilpasses mer individuelt. Ikke tilstrekkelig seleksjon av pasienter kan være en annen årsak til sviktende resultat av studiene (16). Både RENEWAL og ATTACH inkluderte kun et begrenset antall pasienter med så alvorlig hjertesvikt at en kan forvente signifikant inflammasjon og immunaktivering. Infliximab forårsaker umiddelbar undertrykking av TNFalfa. Dette kan forårsake en såkalt "TNF-rebound-effekt", hvor TNFalfa-nivåene høynes kompensatorisk til nivåer høyere enn før behandling (16). Som nevnt tidligere binder infliximab også TNFalfa som er bundet til celleoverflaten. Dette kan føre til komplement-aktivering, og lysering av cellen, noe som ikke er ønskelig i kardiomyocytene til pasienter med hjertesvikt (16).

Bredspektret strategi

Mer bredspektret strategier for antiinflammatorisk behandling av hjertesvikt er under utprøving. Jeg tar her for meg noen av de studiene som har vist mest lovende resultater.

Pentoksifyllin (Trental) er et hemoreologisk middel som bedrer muskelblodstrøm og lokal vevsernæring, og brukes av pasienter med *claudicatio intermittens*. Det har og vist å kunne bedre hjertefunksjon, livskvalitet og treningstoleranse hos pasienter med idiopatisk dilatert kardiomyopati (17). Lignende effekter observeres hos pasienter med iskemisk kardiomyopati, når det blir gitt sammen med standard terapi (17). Pentoksifyllin hemmer TNFalfa in vitro (17). Man har imidlertid ikke klart å påvise lavere plasma-nivåer av TNFalfa ved bruk.

Immunoabsorpsjon er en teknikk hvor en fjerner spesifikke antistoffer fra sirkulasjonen (15,16,17). I en liten prospektiv *case-control*-studie, fikk 34 pasienter behandling med immunoabsorpsjon. Alle disse stod på liste for hjertetransplantasjon, og hadde høye nivåer av antibeta-1 antistoffer. Resultatet av studien var at LVEF ble forbedret fra 22% til 38%, samt forbedring av systolisk- og endediastolisk volum (15,16). Tre måneder etter behandling, klarte man ikke lenger å påvise antibeta-1 antistoffer i blodet til pasientene (15,16). Selv om denne studien var liten, var forbedringen så stor, at det blir spennende å følge videre studier. Hvorvidt bedringen kom av at man fjernet antistoffene, eller kom av en mer uspesifikk supresjon av inflammasjonen, er uvisst.

Intravenøse immunoglobuliner (IVIG), blir idag brukt i vidt omfang som behandling av immunsykdommer. Det er foreslått flere mekanismer for hvordan IVIG modulerer immunsupresjon. Man har imidlertid ingen klar forståelse av dette (15). Det er gjort minst to randomiserte, kontrollerte studier hvor en prøver ut behandling med IVIG til hjertesviktpasienter. I den første studien undersøkte man 62 pasienter med nyoppstått kardiomyopati (15). Pasientene ble randomisert til å motta høydose IVIG i to påfølgende dager. Etter 6 mnd så man på evt forandring i LVEF. Resultatene var overraskende. LVEF hos placebo-behandlede pasienter økte fra 23% til 42%, og det var ingen forskjell fra gruppen som fikk IVIG. En annen studie undersøkte 40 pasienter med LVEF < 40%, og NYHA II-IV (15,17). Pasientene ble randomisert og fikk månedlig behandling i 6 mnd. Her så man forskjell

mellom gruppene. LVEF økte fra 26% til 31%, og man så bedring i funksjonsklasse (NYHA), hos gruppen som fikk IVIG. Hos denne gruppen fant man også økning i minst tre antiinflammatoriske peptider: IL-10, og løselige reseptorer for IL-1 og TNF. Studiene som er blitt gjort med IVIG-behandling har inneholdt forholdsvis få pasienter, og man trenger derfor større studier for å fastslå hvilke potensiell rolle IVIG har i behandling av hjertesvikt.

Celacade er en ikke-farmakologisk behandlingsform, som også er kjent som immunmodulerende-terapi (IMT) (15,16,17). Man behandler pasientens blod ex-vivo med oksidative og termale stressorer (oksidierende agens, UV-lys og forhøyet temperatur), noe som medfører apoptose. Det behandlede blodet føres tilbake til pasienten intramuskulært. De apoptotiske cellene stimulerer antiinflammatoriske cytokiner og undertrykker proinflammatoriske cytokiner.(15,16,17) 2408 pasienter med kronisk hjertesvikt ble med i en studie for å undersøke effektene av Celacade på hjertesvikt(15,16,17). Studien var randomisert, placebokontrollert og dobbeltblindet. Det primære endepunktet var kumulativ insidens (tiden til første hendelse) av det kombinerte endepunktet av tid til død intreffer (mortalitet) og tid til første hospitalisering av kardiovaskulær årsak (morbidity). Forskjellen mellom Celacade- og placeogruppen var ikke statistisk signifikant. Dersom man bare så på pasientene med lettere grad av hjertesvikt som var med i forsøket (NYHA II og NYHA III/IV uten gjennomgått hjerteinfarkt), fant man imidlertid en reduksjon på 31% (mortalitet og morbidity). Dette kan tyde på at IMT er mest effektivt i tidlige stadier av hjertesvikt. En mulig forklaring på dette kan være at inflammasjonsprosessen i hjertet etter hvert blir irreversibel, og resistent mot antiinflammatorisk behandling.

Konklusjon

Resultatene av forsøkene har vist enkelte spennende tendenser. Særlig effekten TNFalfa synes å ha ved å senke utslipp av LD. Noe som kan tyde på en viss beskyttende effekt overfor hjerteceller. Resultatene bekreftet videre at TNFalfa induserer redusert opptak av calcium og glukose første timen etter reoksygenering, noe som var i tråd med våre hypoteser. To timer etter reoksygenering viste imidlertid opptaket av TNFalfa eksponerte celler høyere enn kontroll. Det har dessverre vært litt for stor variasjon i resultatene til at vi kan konkludere med at resultatene er signifikante.

Spesifikk hemming av TNFalfa er prøvd ut i kliniske studier, men har ikke vist den effekten man har håpet på. TNFalfa og cytokiner spiller antakelig en viktig rolle i remodeleringen av hjertet ved hjertesvikt. De inngår i et svært intrikat samspill med en rekke andre faktorer. Selv om man vet mye i dag, er det fortsatt en del huller i vitenskapens forståelse av hvordan dette samspillet fungerer. En målrettet antiinflammatorisk behandling av hjertesvikt ligger nok fortsatt noe frem i tid.

Man har imidlertid sett lovende tendenser ved enkelte mer bredspektrede tilnærminger til antiinflammatorisk behandling av hjertesvikt. Det vil bli spennende å følge videre forskning fremover.

Reference List

1. Tonnessen, T., Florholmen, G., Henriksen, U. L., and Christensen, G. (2003) *Clin. Physiol Funct. Imaging* **23**, 263-268
2. Damas, J. K., Eiken, H. G., Oie, E., Bjerkeli, V., Yndestad, A., Ueland, T., Tonnessen, T., Geiran, O. R., Aass, H., Simonsen, S., Christensen, G., Froland, S. S., Attramadal, H., Gullestad, L., and Aukrust, P. (2000) *Cardiovasc. Res.* **47**, 778-787
3. Feldman, A. M., Combes, A., Wagner, D., Kadakomi, T., Kubota, T., Li, Y. Y., and McTiernan, C. (2000) *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 537-544
4. Plomgaard, P., Bouzakri, K., Krogh-Madsen, R., Mittendorfer, B., Zierath, J. R., and Pedersen, B. K. (2005) *Diabetes* **54**, 2939-2945
5. Opie, L. H., Commerford, P. J., Gersh, B. J., and Pfeffer, M. A. (2006) *Lancet* **367**, 356-367
6. Lecour, S., Suleman, N., Deuchar, G. A., Somers, S., Lacerda, L., Huisamen, B., and Opie, L. H. (2005) *Circulation* **112**, 3911-3918
7. Luo, T. and Xia, Z. (2006) *Anesth. Analg.* **103**, 110-6, table
8. Shen, H. M. and Pervaiz, S. (2006) *FASEB J.* **20**, 1589-1598
9. Chen, X. L., Zhang, Q., Zhao, R., and Medford, R. M. (2004) *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **286**, H1001-H1007
10. Damas, J. K., Aukrust, P., Ueland, T., Odegaard, A., Eiken, H. G., Gullestad, L., Sejersted, O. M., and Christensen, G. (2001) *Basic Res. Cardiol.* **96**, 345-352
11. Damas, J. K., Gullestad, L., Aass, H., Simonsen, S., Fjeld, J. G., Wikeby, L., Ueland, T., Eiken, H. G., Froland, S. S., and Aukrust, P. (2001) *J. Am. Coll. Cardiol.* **38**, 187-193
12. Nian, M., Lee, P., Khaper, N., and Liu, P. (2004) *Circ. Res.* **94**, 1543-1553
13. Mehra, V. C., Ramgolan, V. S., and Bender, J. R. (2005) *J. Leukoc. Biol.* **78**, 805-818
14. Takano, H., Hasegawa, H., Nagai, T., and Komuro, I. (2003) *Internal Medicine* **42**, 465-469
15. Cels, R., Torre-Martinez, G., Torre-Amione, G. (2008) *Lippincott Williams & Wilkins* **23**, 254-260
16. Ayman, A. E. (2008) *J. Cardiac Fail.* **14**, 61-74
17. Gong, K. Z., Song, G., Spiers, J. P., Kelso, E. J., Zhang, Z. G., (2007) *Int. J. Clin. Pract.* **61**, 611-621